

Producción de poligalacturonasa por *Pichia anomala* aislada en la provincia de Misiones

Production of polygalacturonase by *Pichia anomala* isolated in the province of Misiones

Martos MA (1), Heck M (1), Zubreski ER (1), Hours RA (2)

(1) FCEQyN. UNAM. Posadas. Misiones.

(2) CINDEFI -UNLP, CCT-La Plata, CONICET

Félix de Azara 1552. CP 3300. Posadas. Misiones. Argentina

amartos@fceqyn.unam.edu.ar

RESUMEN

Las enzimas pécticas microbianas son de interés en la industria de alimentos principalmente por su uso en el procesamiento de frutas y vegetales (elaboración de vinos, extracción y clarificación de jugos de frutas, extracción de aceites vegetales, maceración de vegetales, etc.). Las pectinasas constituyen un complejo sistema enzimático que incluye: pectinesterasas (PE), poligalacturonasas (PG) y pectinliasas (PL). El objetivo del presente trabajo fue estudiar la cinética de producción de PG por *Pichia anomala*, levadura aislada en la provincia de Misiones, en medios de cultivos con diferentes concentraciones de la fuente de carbono y energía (FCE) y de la fuente de nitrógeno.

Los cultivos se realizaron en Erlenmeyers de 500 ml conteniendo 95 ml de un medio compuesto por 5 ó 10 g/l de glucosa; 0, 5, 10 ó 20 g/l de pectina de citrus y 6,7 ó 13,4 g/l de Yeast Nitrogen Base (YNB). Los mismos se incubaron a 30 °C, con agitación (150 rpm). Se tomaron muestras cada 12 h hasta los 3 días. La biomasa se separó por centrifugación y el sobrenadante se mantuvo a -18 °C hasta su utilización para la medida de la actividad PG (por determinación de grupos reductores liberados a partir de ácido poligalacturónico, mediante el método DNS) y glucosa residual (mediante kit enzimático).

En los medios conteniendo 5 g/l de glucosa como única FCE, la producción de PG fue despreciable. Al adicionar 5 ó 10 g/l de pectina, la enzima se expresó alcanzando valores de 60 UE/ml y 99 UE/ml, respectivamente, a las 30 h de cultivo, pero no se incrementó con 20 g/l de pectina. El incremento en la concentración de glucosa o de YNB resultó en un aumento de la actividad enzimática. Se obtuvieron valores de actividad PG de 168 UE/ml y 145 UE/ml en medios con 10 g/l de glucosa y 13,4 g/l de YNB, respectivamente. La mayor producción de biomasa se obtuvo entre las 24 y 30 h de cultivo en todas las experiencias, tiempo a partir del cual el microorganismo entró en fase estacionaria. Al aumentar la concentración de pectina no se observó un aumento en la cantidad de biomasa, esto indicaría que el microorganismo no es capaz de utilizar pectina como FCE pero si la necesita como inductor. La máxima producción de PG se obtuvo durante las primeras 24-30 h de cultivo (crecimiento exponencial). El pH disminuyó en el transcurso de las fermentaciones en todos los medios estudiados (probablemente los ácidos orgánicos producidos no fueron metabolizados por el microorganismo). La glucosa fue rápidamente metabolizada ya que luego de 24-30 h se obtuvieron valores despreciables en todos los medios ensayados, coincidiendo con el máximo crecimiento microbiano.

Pichia anomala es capaz de producir PG en medios de cultivo con glucosa, pectina e YNB. La producción de PG se realizó durante la fase de crecimiento exponencial, no es reprimida por glucosa y es inducida por pectina.

ABSTRACT

Microbial pectinases are very important in food industries mainly for their use in fruit and vegetable processing (winemaking, extraction and clarification of fruit juices, vegetable oil extraction, maceration of vegetables, etc.). Pectinases constitute a complex pool of enzymes that include: pectinesterases (PE), polygalacturonases (PG) and pectinlyases (PL). The objective of the present work was to study the kinetics of PG production by *Pichia anomala*, a wild yeast isolated in the province of Misiones, in culture media with different concentrations of carbon and energy source (CES) and nitrogen source.

Cultures were grown in 500 ml-Erlenmeyer flasks with 95 ml of a medium containing 5 or 10 g/l glucose; 0, 5, 10 or 20 g/l citrus pectin and 6.7 or 13.4 g/l Yeast Nitrogen Base (YNB), at 30 °C, in a rotary shaker (150 rpm). Samples were taken every 12 h up to 3 days. Biomass was separated by centrifugation and the supernatant was kept at -18 °C until used for PG assay (by measuring the reducing groups released from polygalacturonic acid by DNS method) and residual glucose (by enzymatic kit).

In culture media containing 5 g/l glucose as a sole CES, PG production was negligible. The enzyme was expressed by addition of 5 or 10 g/l of pectin, reaching values of 60 EU/ml and 99 EU/ml, respectively, at 30 h of cultivation, but enzyme activity did not increase with 20 g/l of pectin. The increase in the concentration of glucose or YNB resulted in an increase in enzyme activity. PG activity values of 168 EU/ml and 145 EU/ml were found in media with 10 g/l glucose and 13.4 g/l of YNB, respectively. The highest biomass production was obtained between 24 and 30 h of culture in all experiments, time at which the microorganism reached the stationary phase. Higher concentration of pectin did not result in an increase in biomass concentration; this would indicate that the microorganism is not capable of using pectin as CES but it is necessary as enzyme inducer. Maximum PG production was obtained during the first 24-30 h of culture (exponential growth). pH decreased during fermentation in all media studied (probably organic acids produced were not metabolized by the microorganism). Glucose was rapidly metabolized; negligible values were found in all media tested after 24-30 h of culture, coinciding with the maximum of microbial growth.

Pichia anomala is capable of producing PG in culture media containing glucose, pectin and YNB. PG production takes place during the exponential growth phase; its production is not repressed by glucose and is induced by pectin.

PALABRAS CLAVE: *pectinasas, Pichia anomala, poligalacturonasa.*

KEYWORDS: *pectinases, Pichia anomala, polygalacturonase.*

INTRODUCCIÓN

Las sustancias pécticas, presentes en la lámina media y en la pared celular primaria de plantas superiores, están formadas por unidades de ácido D-galacturónico unidas por enlaces glicosídicos α -1,4, con los grupos carbonilos parcialmente esterificados con metanol. Las enzimas que hidrolizan sustancias pécticas se conocen como enzimas pécticas o pectinasas. Constituyen un complejo sistema enzimático que incluye: pectinesterasas (PE), poligalacturonasas (PG) y pectinliasas (PL). Las PE hidrolizan los ésteres metílicos de moléculas de pectina, liberando metanol. Las PL y PG son enzimas depolimerizantes, degradan enlaces glicosídicos ya sea por un mecanismo de hidrólisis (PG) o por un mecanismo de β -eliminación (PL) (Jayani *et al.* 2005, Favela-Torres *et al.* 2006, Tari *et al.* 2007).

Las pectinasas microbianas son de interés comercial ya que son utilizadas en el procesamiento industrial de frutas en las etapas de extracción y clarificación, en la maceración de tejidos vegetales (Kashyap *et al.* 2000, Ranveer *et al.* 2005). Estos últimos tratamientos son de interés en la producción de néctares de frutas y en la elaboración de purés vegetales (papa, zanahoria, etc.) (Nakamura *et al.* 1995). Teniendo en cuenta que el costo del medio de fermentación es uno de los principales factores determinantes de la producción de enzimas pécticas, es importante formular medios de cultivos de bajo costo y que al mismo tiempo provean los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento adecuado del microorganismo y la producción de las enzimas extracelulares (Nighojkar *et al.* 2006). Las pectinasas son enzimas generalmente inducibles y por lo tanto la presencia de pectina es necesaria en el medio de fermentación (Schwan *et al.* 1997, Malvessi y Silveira 2004, Hellí *et al.* 2001).

Pichia anomala, una levadura aislada en la Cátedra de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM), tiene la capacidad de crecer en medio líquido con glucosa y pectina de citrus como fuentes de carbono y energía (FCE) y producir enzimas extracelulares con actividad pectinolítica. En el presente trabajo se estudió la influencia de la FCE y de la fuente de nitrógeno sobre la producción de PG, a los efectos de encontrar las mejores condiciones para obtener extractos enzimáticos con alta actividad PG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

Pichia anomala, aislada en la Cátedra de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (UNaM) a partir de frutas cítricas en descomposición.

Medios de cultivos

Medio de conservación. Extracto de levadura, 5 g/l; triptona, 5 g/l; glucosa, 10 g/l; agar, 18 g/l, pH: 5.

Medio de fermentación (g/l). Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco), 6,7 ó 13,4; glucosa 5 ó 10; pectina de cítricos 0, 2,5, 5, 10 ó 20.

Todos los componentes del medio fueron esterilizados a 1 atm, 15 min, excepto en el caso de la solución de YNB, la que se esterilizó en forma separada por filtración a través de un filtro de celulosa de 0,45 μm (Blanco *et al.* 1999).

Producción de enzimas pécticas

Inóculo. A partir de cultivos jóvenes de la levadura (24 h), desarrollados en estrías de medio de conservación a 30 °C, se preparó una suspensión de células en Erlenmeyers que contenían 30 ml de agua destilada estéril, a partir de la cual se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener una suspensión celular con un valor de A_{620} de alrededor de 0,96, la cuál se tomó como inóculo para la fermentación.

Fermentación. Se inocularon Erlenmeyers de 500 ml conteniendo 95 ml del medio de fermentación correspondiente con 5 ml del inóculo proveniente de una estría joven de la levadura en estudio. Los mismos se incubaron a 30 °C, con agitación (150 rpm). El cultivo se muestreó cada 12 h aproximadamente, hasta los 3 días. Las muestras fueron centrifugadas para remover las células de levadura. El sobrenadante se mantuvo a – 18 °C hasta su utilización. Todas las experiencias se realizaron por triplicado.

Determinaciones analíticas

Determinación de la actividad pectinolítica del extracto enzimático por el método del hoyo (cup plate assay). Se realizaron hoyos de 5 × 4 mm, en placas que contenían ácido poligalacturónico (81325 - Fluka) al 1 % en buffer acetato de sodio-ácido acético (AcB, 0,2 M, pH: 5,0) y agar (1,8 %). A cada hoyo se le agregó 45 μl del filtrado enzimático. Las cajas se incubaron a 35 °C hasta 4 d y se inundaron con HCl (5 N) como revelador. La actividad pectinolítica se determinó por medida del diámetro de los halos de hidrólisis formados (Souza *et al.* 2003).

Determinación de la actividad poligalacturonasa (PG). La actividad PG se determinó mezclando 2,9 ml de una solución de ácido poligalacturónico (P-3889, Sigma) al 0,2 % en AcB (0,2 M, pH 4,5), con 0,1 ml del filtrado enzimático diluido apropiadamente. Las muestras (por duplicado) se incubaron a 37 °C durante 10 min y se determinaron los grupos reductores liberados por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), usando ácido galacturónico como referencia (Miller 1959). Una unidad enzimática (UE) de PG se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ácido galacturónico por min en las condiciones de ensayo.

Biomasa. El crecimiento microbiano ($g_{\text{celula seca}}/\text{l}$) se determinó por mediciones de densidad óptica (DO_{620}), utilizando una curva de calibración entre peso seco y densidad óptica.

Glucosa residual. Se utilizó el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (Glicemia, Wiener, Argentina) (Contreras Esquivel *et al.* 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pichia anomala fue capaz de producir enzimas pécticas en el medio líquido utilizado. La actividad pectinolítica del extracto enzimático se evidenció por la presencia de los halos de hidrólisis desarrollados en placas conteniendo ácido poligalacturónico, luego de haber sido incubadas durante 24 h y 48 h (**Figura 1**).

Los resultados de las experiencias para evaluar el efecto de la concentración de los diferentes sustratos sobre la producción de PG y biomasa se presentan en las **Figuras 2 y 3**, respectivamente.

Los resultados de las experiencias (**Figura 2**) demuestran que en medios conteniendo 5 g/l de glucosa como única FCE, la producción de PG fue despreciable. Al adicionar 5 ó 10 g/l de pectina, la enzima se expresó alcanzando valores de 60 UE/ml y 99 UE/ml, respectivamente, a las 30 h de cultivo. Estos resultados indican la necesidad de un inductor (pectina) para estimular la producción PG por la levadura en estudio. Con 20 g/l de pectina (medio 4) no hubo un aumento con respecto al medio con 10 g/l, lo que pudo deberse a una limitación de algún otro sustrato en los medios de cultivos. El

incremento en la concentración de glucosa (medio 5) o de YNB (medio 6) resultó en un aumento en la actividad enzimática. Se obtuvieron valores de actividad PG de 168 UE/ml a las 30 h de cultivo y de 145 UE/ml a las 54 h en medios con 10 g/l de glucosa y 13,4 g/l de YNB respectivamente.

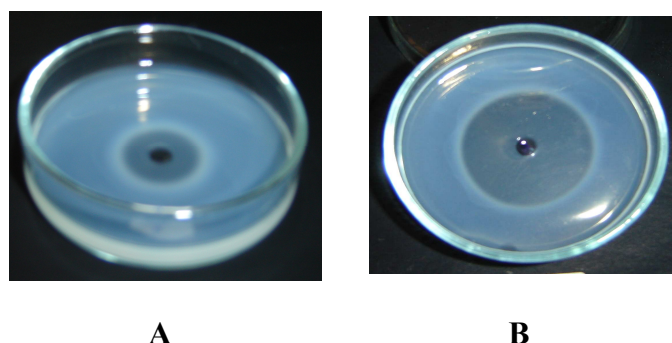


Figura 1: Halos de hidrólisis sobre placas con ácido poligalacturónico producidos por los extractos enzimáticos de *P. anomala*, a diferentes tiempos de incubación (A: 24 h y B: 48 h).

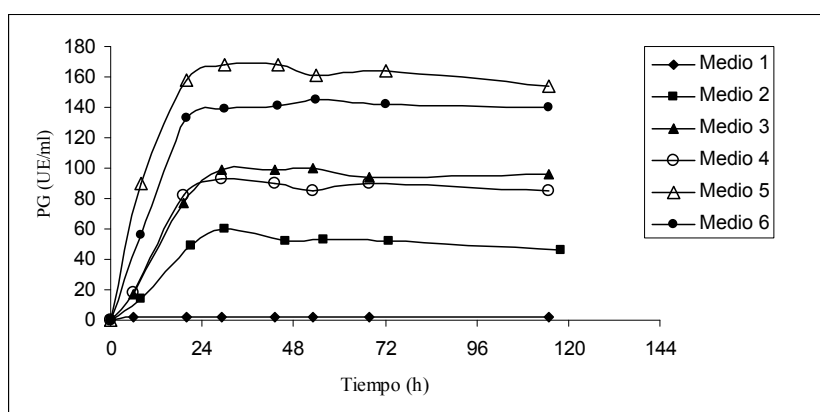


Figura 2: Producción de poligalacturonasa por *P. anomala* en diferentes medios de cultivo:

Medio 1 (g/l): YNB 6,7; glucosa 5; pectina 0. **Medio 2** (g/l): YNB 6,7; glucosa 5; pectina 5. **Medio 3** (g/l): YNB 6,7; glucosa 5; pectina 10. **Medio 4** (g/l): YNB 6,7; glucosa 5; pectina 20. **Medio 5** (g/l): YNB 6,7; glucosa 10; pectina 10. **Medio 6** (g/l): YNB 13,4; glucosa 5; pectina 10.

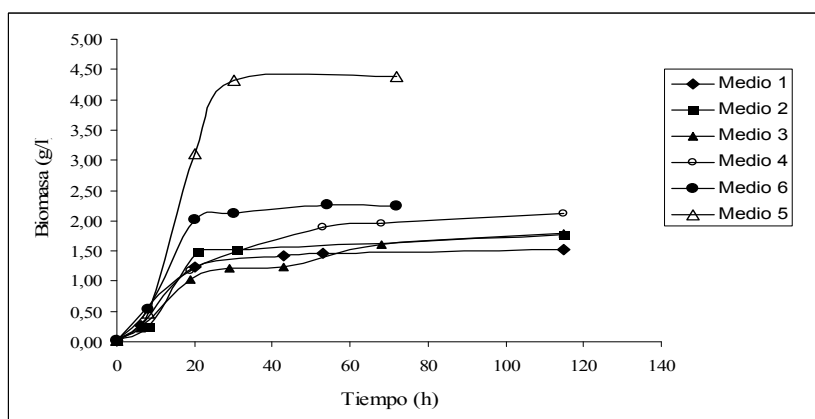


Figura 3: Producción biomasa en función del tiempo, durante el cultivo de *P. anomala* en los diferentes medios de cultivo. Los símbolos son los mismos que los que se describieron en la Fig. 2.

En la **Figura 3** se observa que la mayor producción de biomasa se obtuvo entre las 24 y 30 h de cultivo en todas las experiencias, tiempo a partir del cual el microorganismo entró en fase estacionaria.

La biomasa producida fue similar para los medios que contenían 5 g/l de glucosa (medios 1 al 4). Al aumentar tanto la fuente de nitrógeno (YNB) como la glucosa, la cantidad de biomasa aumentó, obteniéndose los mayores valores de 4,38 g/l para el medio 5 que contenía 10 g/l de glucosa. Al aumentar la concentración de pectina no se observó un aumento en la cantidad de biomasa, esto indicaría que el microorganismo no es capaz de utilizar pectina como FCE pero si la necesita como inductor de la síntesis enzimática. La máxima producción de PG se obtuvo durante las primeras 24-30 h de cultivo, coincidiendo con la fase de crecimiento exponencial.

Los valores de pH y glucosa residual obtenidos en el transcurso de las diferentes fermentaciones realizadas se presentan en las **Figuras 4 y 5**, respectivamente.

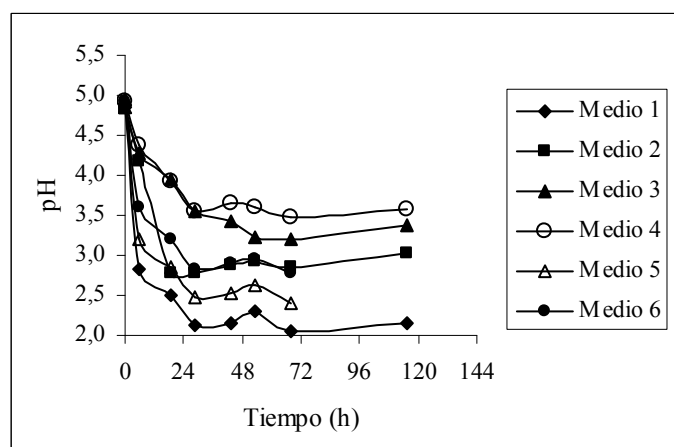


Figura 4. Variación del pH del medio en función del tiempo, durante el cultivo de *P. anomala* en los diferentes medios de cultivo. Los símbolos son los mismos que los que se describieron en la Fig. 2.

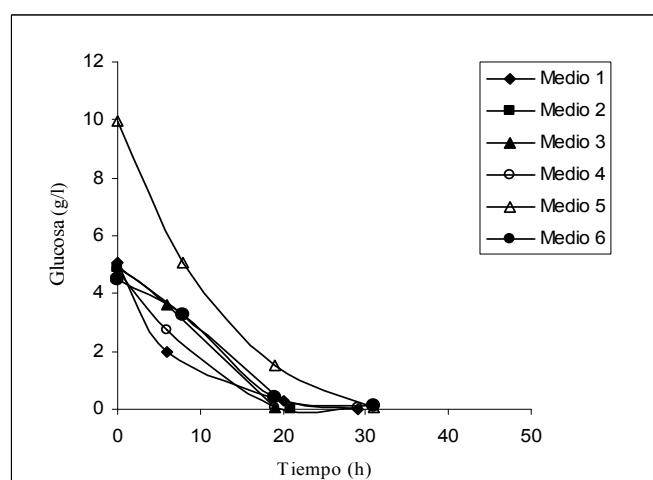


Figura 5. Glucosa residual en función del tiempo, durante el cultivo de *P. anomala* en los diferentes medios de cultivo. Los símbolos son los mismos que los que se describieron en la Fig. 2.

El pH disminuyó en el transcurso de las fermentaciones en todos los medios estudiados, alcanzando valores entre 2,5 y 3,5, a las 24 h de cultivo (**Figura 4**). Estos valores de pH no afectan la estabilidad de PG ya que en estudios previos se determinó que la misma es estable en un rango de pH entre 2,5 a 5,5. De la evolución de los valores de pH en el transcurso de las fermentaciones, se consideró que los ácidos orgánicos producidos no fueron metabolizados por el microorganismo en estudio.

La glucosa (**Figura 5**) fue rápidamente metabolizada por la levadura. Luego de 24 h aproximadamente se obtuvieron valores despreciables en todos los medio ensayados, esto coincide con el mayor crecimiento microbiano.

Blanco *et al.* (1999) informaron que la producción de pectinasas es una capacidad constitutiva en la mayoría de las levaduras porque no se requiere pectina, ácido poligalacturónico o ácido galacturónico

para inducir la síntesis de dichas enzimas. Schwan *et al.* (1997) informaron que la síntesis de PG por *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *chevalieri* y *Candida rugopelliculosa* no aumentó con el agregado de pectina o ácido poligalacturónico al medio de cultivo que contenía glucosa. Moyo *et al.* (2003) informaron que la producción de pectinasas por *Kluyveromyces wickerhamii* fue constitutiva, considerando que la misma fue producida en ausencia de pectina. Sin embargo, la capacidad pectinolítica de algunas especies de levaduras, tales como *Cryptococcus albidus* y *Geotrichum lactis* (Blanco *et al.* 1999) han sido consideradas como inducibles. Este último parecería ser el caso de *Pichia anomala*.

CONCLUSIONES

Pichia anomala es capaz de producir enzimas pécticas en cultivo sumergido utilizando medios conteniendo glucosa, pectina y YNB. Los mayores valores se obtuvieron con los filtrados enzimáticos provenientes de los cultivos realizados en los medios que contenían glucosa, 10 g/l, adicionados con pectina de citrus, 10 g/l e YNB, 6,7 g/l. En este último medio la actividad PG fue de 168 UE/ml. Dicha actividad pectinolítica no fue reprimida por glucosa y fue inducida por pectina. La producción de PG se realizó durante la fase de crecimiento exponencial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Blanco P, Sieiro C, Villa TG. 1999. Production of pectic enzymes in yeasts. Mini Review. FEMS Microbiol. Lett., 175: 1-9.
- Contreras Esquivel JC, Hours RA, Voget CE, Mignone CF. 1999. *Aspergillus kawachii* produces an acidic pectin releasing enzyme activity. J. Biosc. Bioeng., 88: 48-52.
- Favela-Torres E, Volke-Sepulveda T, Viniegra-Gonzalez G. 2006. Production of hydrolytic depolymerising pectinases - A review. Food Technol. Biotechnol., 44: 221-227.
- Hellí P, Ros JM, Laencina J. 2001. Changes in high and low molecular weight carbohydrates during *Rhizopus nigricans* cultivation on lemon peel. Carbohydr. Polym., 45: 169-174.
- Jayani RS, Shivalika S, Reena G. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochem., 40: 2931-2944.
- Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. 2000. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technol., 77: 215-227.
- Malvessi E, Silveira MM. 2004. Influence of medium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Braz. Arch. Biol. Technol., 47: 693-702.
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31: 426-428.
- Moyo S, Gashe BA, Collison EK, Mpuchane S. 2003. Optimizing growth conditions for the pectinolytic activity of *Kluyveromyces wickerhamii* by using response surface methodology. Int. J. Food Microbiol., 85: 87-100.
- Nakamura T, Hours RA, Sakai T. 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. J. Food Sci., 60: 468-472.
- Nighojkar S, Phanse Y, Sinha D, Nighojkar A, Kumar A. 2006. Production of polygalacturonase by immobilized cells of *Aspergillus niger* using orange peel as inducer. Process Biochem., 41: 1136-1140.
- Ranveer SJ, Shivalika S, Reena G. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. Process Biochem., 40: 2931-2944.

Schwan RF, Cooper RM, Wheals AE. 1997. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 234-244.

Souza JVB, Silva E S, Maia MLS, Teixeira MF. 2003. Screening of fungal strains for pectinolytic activity: endopolygalacturonase production by *Peacilomyces clavisporus* 2A.UMIDA.1. *Process Biochem.*, 39: 455-458.

Tari C, Göğüs N, Tokatli F. 2007. Optimization of biomass, pellet size and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 using response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.*, 40: 1108-1116.